

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN TERAPIE AVANZATE MEDICO
CHIRURGICHE 30° CICLO
Coordinatore: Prof. Giovanni Di Minno

TESI DI DOTTORATO

L'USO DELL'ENDOMICROSCOPIA CONFOCALE NELLO
STUDIO IN VIVO DELLA CARATTERISTICHE TUMORALI
CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLA NEO-ANGIOGENESI

RELATORE

CANDIDATO

Chiar.mo Prof.
Esposito
Giovanni D. de Palma

Dott. Dario

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

INDICE

Indice	2
Premesse scientifiche	1
Il cancro colo rettale precoce	1
L'Endomicroscopia Laser Confocale	9
Il progetto	15
Obiettivi dello studio	15
Metodi	15
Analisi statistica	17
Risultati	18
Pattern Morfologici alle immagini CLE	19
Immunoistochimica	23
Discussione	24
Conclusioni	25
Bibliografia	26

PREMESSE SCIENTIFICHE

Il cancro colo rettale precoce

Il carcinoma coloretale (CCR) rappresenta la terza più comune neoplasia a livello globale con un'incidenza di stimata in 5-6000 casi per 100000 nella popolazione adulta. ^[1]

La sopravvivenza dei pazienti varia grandemente a seconda dello stadio alla diagnosi calando dal >90% dei casi diagnosticati in stadio precoce a <10% in quei casi già metastatici alla diagnosi. Appare chiaro come sia di fondamentale importanza la rilevazione di neoplasia in fase ancora precoce nella popolazione sia generale che a rischio. ^[2,3] E' stato dimostrato come l'esecuzione di colonscopia di screening sia in grado di ridurre l'incidenza e/o la mortalità del CCR ^[4,5]; la colonscopia di screening è attualmente consigliata nella maggior parte dei paesi europei.

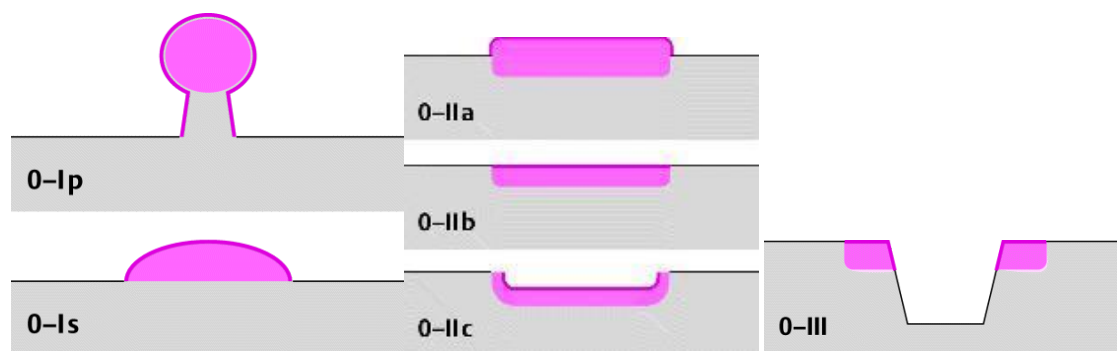
La diagnosi e la rimozione di lesioni precancerose nel corso della colonscopia indice sono procedure semplici ed in grado di ridurre la futura incidenza di CCR avanzati e ridurre così la mortalità per neoplasia colo-rettale. ^[4,6]

ESGE (Endoscopic Society of Gastrointestinal Endoscopy) afferma che la maggioranza delle lesioni coliche e rettali con invasività superficiale possa essere efficacemente trattata in maniera curativa mediante tecniche mininvasive quali la polipectomia standard o la EMR (endoscopic mucosal resection). ^[7]

Con il diffondersi dei programmi di screening del cancro coloretale, è da attendersi un aumento della diagnosi di lesioni localmente avanzate ma non ancora invasive passibili di terapia endoscopica. ^[7,8]

La classificazione di Parigi (Fig.1) delle lesioni superficiali^[9], modificata nel 2005 viene utilizzata per predire l'istologia delle lesioni ^[10-12]. La classificazione originale delle lesioni proposta da Kudo nel 1993 ^[13] da cui deriva la classificazione di Parigi comprendeva le LST, distinte in granulari (omogenee o nodulari-miste) e non granulari. Il termine LST, pur non facendo parte della classificazione di Parigi viene utilizzato anche in occidente per definire lesioni piane di diametro superiore a 10 mm.

L'utilità della classificazione di Parigi, però, è messa in discussione dal momento che la concordanza inter-operatore quando applicata è risultata essere bassa (kappa 0.42). ^[14]



Lesioni di tipo 0-I: Sessili (0-Is), Peduncolate (0-Ip)	Lesioni di tipo 0-II: Rilevate (0-IIa), Piane (0-IIb), Depresse (0-IIc)	Lesioni di tipo 0-III: Ulcerate
---	---	---------------------------------

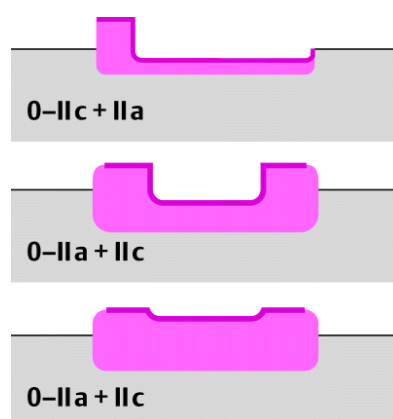


Fig. 1: Classificazione di Parigi. Endoscopy 2005; 37(6): 570-578

Allo scopo di migliorare le capacità di identificare e stratificare il rischio di invasione profonda delle lesioni rinvenute in corso di colonscopia, sono state sviluppate numerose metodiche di imaging endoscopico avanzato. ^[15]










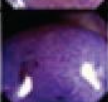




L'endoscopia semplice effettuata con attuali sistemi endoscopici (HD-WLE) utilizza apparecchiature equipaggiate con sensori ad alta definizione (1080 linee di risoluzione verticale) e viene definita "endoscopia a luce bianca" (WLE - White Light Endoscopy).

La cromoendoscopia utilizza coloranti di contrasto (i.e. Indaco di Carminio o Cresyl-Violetto) per evidenziare i contorni delle strutture mucose superficiali. I coloranti sono spruzzati con cateteri spray o direttamente attraverso il canale operatore dell'endoscopio.

Il termine "cromoendoscopia virtuale" si riferisce ad una serie di tecnologie di trattamento delle immagini integrate nel processore con l'obiettivo, anche queste, di migliorare la definizione dei contorni delle strutture della mucosa. Tutti i tre maggiori produttori di sistemi per l'endoscopia (Olympus Medical Systems, Pentax Medical e Fujinon Endoscopy) hanno introdotto dei sistemi proprietari chiamati rispettivamente *Narrow-Band Imaging* (NBI), *iSCAN* e *FICE*. I tre sistemi funzionano in maniera differente ma hanno in comune il l'obiettivo finale di ridurre la quota di luce rossa nell'immagine o di restringere l'ampiezza di banda della luce in uscita dalla fonte di luce al quella del verde e del blu.

Le tecniche di cromoendoscopia tradizionale o virtuale hanno, come già detto, l'obiettivo di migliorare la definizione delle strutture mucose, valutate mediante la classificazione di Kudo dei pattern della morfologia ghiandolare (Fig. 2) ^[16]

Fig. 2: Classificazione di Kudo della morfologia ghiandolare. Gastroenterol Hepatol (N Y). 2015 Jul;11(7):445-52.27118940

Type I		Round pit (normal pit)		nonneoplastic
Type II		Asteroid pit		nonneoplastic
Type IIIs		Tubular or round pit that is smaller than the normal pit (type I)		neoplastic
Type III_L		Tubular or round pit that is larger than the normal pit (type I)		neoplastic
Type IV		Dendritic or gyrus-like pit		neoplastic
Type V_I		Irregular arrangement and sizes of III _L , III _s , IV type pit pattern		neoplastic
Type V_N		Loss or decrease of pits with an amorphous structure		neoplastic

La EMR consiste nell'asportazione di una lesione mucosa sessile o pedunculata con apposita ansa da polipectomia/mucosectomia previo *lifting mucoso* ottenuto mediante iniezione nella sottomucosa di fisiologica o colloidali. La tecnica può essere utilizzata per il trattamento di lesioni coloretali più piccole di 20 mm ^[17] ma non consente l'asportazione en bloc di lesioni più grandi. La EMR *piecemeal* (in più frammenti di lesioni più grandi compromette la qualità e l'affidabilità della valutazione istopatologica, in particolar per quanto riguarda la valutazione dei margini verticali e laterali; inoltre, l'asportazione piecemeal può aumentare il tasso di recidiva delle lesioni. ^[7]

Pur con i suoi limiti, la EMR è ancora il trattamento più diffuso per le lesioni colo-rettali pre-invasive ed i dati in letteratura mostrano ottimi risultati a lungo termine in termini di radicalità e di sicurezza. Il tasso di successo della EMR si attesta sul 95% quando adoperata correttamente. ^[18-20]

La ESD (endoscopic submucosal dissection) può essere adoperata per lesioni con elevato sospetto di invasione limitata agli strati più superficiali della sottomucosa basando la valutazione dell'applicabilità della tecnica su valutazione di criteri macroscopici quali la morfologia depressa della lesione, il pattern di superficie irregolare o non granulare (specie per lesioni di diametro superiore a 20 mm). La ESD può essere presa in considerazione per lesioni colo-rettali che, altrimenti non potrebbero essere asportate in maniera radicale mediante le tecniche che utilizzano le anse da polipectomia. ^[7]

La ESD è tecnicamente difficoltosa e lunga e, specie nei paesi occidentali, pochi endoscopisti hanno sufficiente esperienza in questa tecnica. ^[7]

Allo stato attuale, le casistiche giapponesi riportano tassi di perforazione in pazienti trattati per lesioni pre-invasive con tecnica ESD del 4.8%^[21], i tassi riportati in altre casistiche variano dal 4% al 10%. I tassi di perforazione riportati per la EMR risultano compresi tra 0.3-0.5%.

Pur con il rischio attuale di perforazione, il rischio di intervento chirurgico resosi necessario in seguito ad ESD complicata risulta essere di circa l'1%. ^[22]

Un recente studio caso-controllo giapponese che comparava l'asportazione endoscopica con la resezione colica per neoplasia coloretali precoci riporta tempi operatori inferiori per l'ESD (113 ± 66 min vs 153 ± 43 min, $P < 0.01$) per lesioni di dimensioni comparabili, anche il tasso di complicanze (10.8% vs 23.6%, $P = 0.06$) risultava inferiore nel gruppo sottoposto ad ESD sebbene il dato non avesse significatività statistica. ^[23]

Il limite all'applicabilità delle tecniche di asportazione endoscopiche sta nell'impossibilità di asportare linfonodi locoregionali potenzialmente metastatici; la sicurezza dell'assenza di metastasi linfonodali è un fattore utile nel *decision-making* della terapia delle neoplasie coliche in fase precoce.

Sulla base di tali premesse appare chiaro come sia di grande utilità selezionare quei pazienti in cui una resezione colica rappresenterebbe un *overtreatment* e per cui una procedura mini-invasiva sarebbe sufficiente.

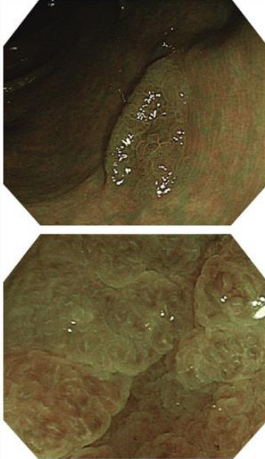
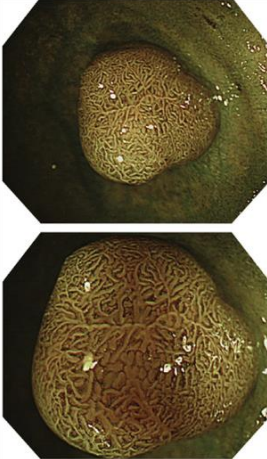
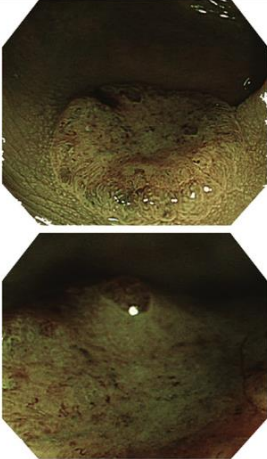
La angiogenesi è un processo essenziale nello sviluppo e nella progressione dei carcinomi.^[24] Numerosi fattori di crescita promuovono la angiogenesi, il VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) è il più importante.^[25]

L'induzione del gene per VEGF e la produzione di questo fattore di crescita quando una neoplasia raggiunge 1-2 mm di diametro risulta nell' *Angiogenetic Switch*, il momento patologico in cui comincia il nuovo sviluppo vascolare in una neoplasia.^[26] Vista l'importanza della valutazione della microvascolarizzazione tumorale, appare naturale come si siano sviluppati dei criteri di classificazione delle alterazioni vascolari delle lesioni mucose (Fig. 3).^[27-29]

LA classificazione NICE (Fig. 3) valuta il colore della lesione, l'aspetto della superficie mucosa e dei vasi visibili per stratificare il rischio di invasività della lesione.

I criteri identificati, però, richiedono l'utilizzo di strumentazione dedicata NBI meglio se con magnificazione ottica dell'immagine ma che non sono ancora sufficientemente diffusi per l'applicazione su larga scala dello studio con NBI.^[30]

Fig. 3: NBI International Colorectal Endoscopic (NICE) Classification. *Gastrointest Endosc.* 2013 Oct;78(4):625-32

	Type 1	Type 2	Type 3
Color	Same or lighter than background	Browner relative to background (verify color arises from vessels)	Brown to dark brown relative to background; sometimes patchy whiter areas
Vessels	None, or isolated lacy vessels coursing across the lesion	Brown vessels surrounding white structures**	Has area(s) of disrupted or missing vessels
Surface Pattern	Dark or white spots of uniform size, or homogeneous absence of pattern	Oval, tubular or branched white structure surrounded by brown vessels**	Amorphous or absent surface pattern
Most likely pathology	Hyperplastic	Adenoma***	Deep submucosal invasive cancer
Examples	  		

L'Endomicroscopia Laser Confocale

L'endomicroscopia laser confocale (Confocal Laser Endomicroscopy – CLE) è una tecnica in grado di fornire immagini ad ingrandimento tale da rendere distinguibili strutture cellulari e *in-vivo* su un determinato piano focale. ^[31] E' possibile, grazie a questa metodica, ottenere un campionamento bioptico virtuale in tempo reale.

Nella microscopia confocale, un laser a bassa potenza viene puntato e messo a fuoco su un singolo punto definito "piano di vista microscopico" (Microscopic field of view), la stessa lente funge sia da condensatore del laser in uscita dal sistema sul tessuto, sia da lente di cammino ottico della luce riflessa dal tessuto in esame e captata dal sistema. Il punto di illuminazione coincide con il punto di detezione all'interno del campione, la luce emanata da quello specifico punto viene messa a fuoco da un *foro stenopeico* sul sistema di detezione dell'immagine. La luce proveniente dai punti diversi dal punto a fuoco non raggiunge il detettore. Il sistema di illuminazione e quello di detezione si trovano sullo stesso piano focale, da qui il termine "confocale". Il segnale luminoso in arrivo dal punto illuminato viene captata, misurata e trasformata in un'immagine digitale in toni di grigio che rappresenta il piano focale del campione esaminato. ^[31]

La microscopia confocale fornisce una risoluzione spaziale migliore rispetto alla microscopia a fluorescenza convenzionale perché l'immagine fornita non viene "contaminata" dalla luce riflessa da piani focali diversi da quello a fuoco.

La microscopia confocale endoscopica è un'evoluzione della microscopia confocale utilizzata in laboratorio. Il sistema utilizza un laser lunghezza d'onda di 488 nm (luce laser blu) generato da ioni di argon passato attraverso una lente

La CLE può essere effettuata, attualmente con due strumentazioni, una integrata in un endoscopio dedicato (Pentax, Tokio, Japan, definita eCLE), ed una con sonde a fibra ottica stand-alone (pCLE) che possono essere passate nel canale operativo di un endoscopio standard (Cellvizio, Mauna Kea Technologies, Paris, France). Al momento, solo la strumentazione pCLE è effettivamente in commercio anche se la eCLE può essere ancora in uso presso più centri. ^[32,33]

La pCLE viene effettuata con il sistema per l'endomicroscopia Cellvizio® (Fig. 4), basato sull'uso di diverse sonde a catetere e su un laser semiconduttore della suddetta lunghezza d'onda di c.ca 488 nm. Esistono diversi modelli di sonda, tutti di fibre ottiche create primariamente per l'utilizzo sul tratto digerente, queste includono CholangioFlex, GastroFlex, ColoFlex, GastroFlex-UHD, and ColoFlex-UHD. La sonda CholangioFlex è studiata per essere specificatamente utilizzata durante ERCP mentre le altre possono essere utilizzate in gastroscopi e colonscopi con un canale operativo di almeno 2,8 mm.

Tutte le sonde generano un'immagine dinamica a 12 frame al secondo con un campo di scansione di 30.000 pixel. Il sistema Cellvizio® ha un campo visivo di 240 µm ed una risoluzione laterale di 1 µm per le sonde GastroFlex-UHD e ColoFlex-UHD, un campo visivo di 600x500 µm ed una risoluzione laterale di 3,5 µm per le sonde GastroFlex e ColoFlex a risoluzione standard.

Il sistema ha una profondità di scansione fissa a seconda del tipo di sonda utilizzata; la profondità di scansione per le sonde GastroFlex e ColoFlex è di 70-130 µm. Una volta acquisite le immagini, queste vengono ricostruite da uno speciale algoritmo per creare "mosaici" con un campo visivo più grande (4 x 2 mm). Le sonde vengono utilizzate ponendone l'estremo distale a contatto con l'area sospetta sul tessuto.



Fig. 4: Strumentazione endomicroscopica Cellvizio e sonda Coloflex UHD

Agenti di contrasto

I tessuti umani non contengono cromofori naturali e quindi non riflettono adeguatamente la luce laser di nessuna lunghezza d'onda. La microscopia laser confocale dei tessuti umani è possibile solo grazie all'utilizzo di agenti di contrasto fluorescenti esogeni. ^[31]

Gli agenti di contrasto più utilizzati sono la fluoresceina sodica (5-10 mL di una soluzione al 10%), l'acriflavina (0,05% solo per uso topico) ed il cresil-violetto. ^[31,34,35] La fluoresceina si lega all'albumina sierica, le molecole di colorante non legate attraversano l'endotelio capillare per penetrare nei tessuti e marcare il tessuto extracellulare; le strutture maggiormente marcate dalla somministrazione di fluopresceina sono i capillari ed il tessuto connettivo. L'acriflavina applicata topicamente marca le cellule epiteliali e colora anche i nuclei. ^[36]

L'utilizzo combinato di fluoresceina ed acriflavina fornisce la migliore caratterizzazione della morfologia microscopica del tessuto ^[37] ma l'utilizzo dell'acriflavina è limitato dal potenziale rischio mutageno della sostanza. ^[38]

Imaging Confocale Colico

Le prime sperimentazioni sull'utilizzo della microscopia confocale sul colon risalgono al 2003 quando Sakashita e colleghi utilizzarono un prototipo di endomicroscopio in grado di passare nel canale operativi dell'endoscopio. ^[39] Numerose esperienze riguardo all'utilizzo dell'endomicroscopia confocale sul colon si sono accumulate negli anni seguenti. ^[31,32,34,38,40-42]

Alla scansione CLE della mucosa colica normale, le ghiandole appaiono come strutture policellulari tondeggianti o esagonali (*honeycomb*) disposte regolarmente; le aperture luminali delle cripte sono visibili come aree rotondeggianti puntiformi nere al centro delle ghiandole e che si proiettano verso la superficie mucosa ed è facile distinguere cellule caliciformi mucipare e cellule colonnari epiteliali.

Dal momento che l'apparecchiatura endomicroscopica fornisce una scansione profonda dell'epitelio, all'esterno delle ghiandole, nella lamina propria, sono facilmente identificabili i capillari. I globuli rossi, non marcati dalla fluoresceina, appaiono come punti neri in movimento nel lume vascolare. ^[32,35] Nelle scansioni effettuate con gli strumenti attuali, le neoplasie intraepiteliali ed i tumori invasivi del colon mostrano un'architettura tubulare, villosa o irregolare con un ridotto numero di *goblet cells*. Inoltre, nelle neoplasie è chiaramente visibile una neovascolarizzazione chiaramente alterata rispetto a quella della mucosa sana. ^[32,40]

L'identificazione di pattern patologici mucosi ha portato a sviluppare una classificazione definita "*confocal pattern classification*" per le lesioni coliche (tab 1). ^[32,40]

L'associazione di endoscopia tradizionale in luce bianca e di imaging endomicroscopico si è dimostrata in grado di valutare la diagnosi istopatologica con grande precisione (sensibilità del 97.4%, specificità del 99.4% ed accuratezze del 99.2%). ^[38]

Tabella 1: Classificazione dei pattern confocali dei quadri mucosi colici. [HYPERLINK](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524145?term=DMID%2F252A.145262025)
["https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524145?term=DMID%2F252A.145262025"](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15524145?term=DMID%2F252A.145262025) Gastroenterology. 2004

Grading	Architettura Vascolare	Architettura delle Criphe
Normale	Esagonale, <i>honeycomb appearance</i> , rete capillare che demarca lo stroma circostante le aperture luminali delle criphe	Aperture delle criphe regolari e rivestite da uno strato omogeneo di cellule epiteliali e caliciformi mucipare
Rigenerativo	Esagonali, <i>honeycomb appearance</i> , con numero di capillari normale o lievemente aumentato	Aperture delle criphe stellate, aggregati focali di criphe di morfologia regolare con caliciformi mucipare ridotte
Neoplastico	Vasi dilatati e distorti con elevato leakage; architettura irregolare con perdita dell'orientamento rispetto al tessuto circostante	Dentellata ed irregolare, perdita di cellule caliciformi mucipare; mucina ridotta o assente

IL PROGETTO

Obiettivi dello studio

Viste le premesse, l'obiettivo dello studio è stato quello di valutare ulteriormente le capacità dell'endomicroscopia laser confocale di identificare pattern specifici di malignità ed, eventualmente, di valutare se la CLE fosse in grado di valutare i pattern vascolare ed, eventualmente, predire il rischio di metastasi linfonodale di modo da identificare quei pazienti per cui un trattamento mini-invasivo sia sufficiente.

Metodi

Sono stati reclutati quattordici pazienti consecutivi affetti da neoplasia maligna coloretale diagnosticata in corso di endoscopia di routine e confermata dall'istologia.

Sono state escluse dallo studio presente, le neoplasie insorte in pazienti affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali e i tumori colo-rettali già trattati con chemio- o radioterapia neoadiuvante. Ulteriori criteri di esclusione sono stati: pazienti di età inferiore a 18 anni, persone incapaci di intendere e di volere, riduzione della funzionalità renale, ittero ed allergia alla fluoresceina. Lo studio è stato preventivamente approvato dal comitato etico del nostro istituto. A tutti i pazienti è stato richiesto uno specifico consenso informato a partecipare ad una sperimentazione clinica.

Prima della procedura, i pazienti erano sottoposti a preparazione del colon mediante somministrazione *per os* di 4L soluzione isotonica di polietilen-glicole il giorno prima della procedura secondo gli schemi utilizzati comunemente nella pratica clinica per la preparazione alla colonscopia. In caso di intolleranza del paziente alla procedura, durante la stessa poteva essere praticata una sedazione cosciente con 5-10 mg di Midazolam e.v.

Le lesioni erano inizialmente identificate mediante endoscopia a luce bianca dopodiché veniva effettuato l'esame CLE.

Tutte le procedure CLE sono state effettuate utilizzando il Cellvizio® Endomicroscopy System (Mauna Kea Technologies, Paris, France) e sonde da 2,5mm modello Coloflex UHD passate attraverso il canale operativo dell'endoscopio. Il sistema così configurato acquisisce immagini

ad un rate di 12 fps con un campo di scansione di 30000 pixel, il campo di visione ottenuto è di 240x200µm con una risoluzione laterale di 1 µm ed una profondità di scansione di 60 µm. Durante l'esame, per limitare l'insorgenza di artefatti da movimento, veniva somministrato un bolo endovenoso (10-20 mg) di Buscopan (N-butilbromuro di loscina) oltre che 10 mL di fluoresceina sodica 10%. L'operatore poneva in contatto la punta della sonda con il tessuto target; eventualmente, veniva montato un cap sulla punta dell'endoscopio per stabilizzare la mucosa.

In tutti i pazienti, sono state eseguite scansioni video di 4 minuti della mucosa francamente tumorale e dell'area adiacente di modo da avere un "controllo" da utilizzare nella valutazione dei pattern confocali della mucosa normale. Le scansioni video, dopo l'esecuzione, sono state salvate e ri-esaminate "offline" in secondo momento. Dai video sono stati estratti i frame più significativi utilizzando il software dedicato fornito dal produttore dell'apparecchiatura.

Tutte le immagini CLE sono state rivalutate, alla qualità delle immagini è stato assegnato un giudizio: "Buona" (assenza di artefatti da movimento, pareti vascolari e globuli rossi facilmente identificabili), "Media" (alcuni artefatti da movimento ma con architettura vascolare comunque visibile), "Scarsa" (artefatti da movimento grossolani che non consentono alcuna interpretazione dell'immagine). Nelle immagini di qualità "Buona" e "Media" sono state ricercate: I Forma dei vasi (dritti vs. irregolari); II Diametro (media in µm); III Presenza di *Branching* vascolare (*Sprouting* - Formazione di nuovi vasi); IV Permeabilità vascolare (Leakage di fluoresceina); V Flusso ematico (normale vs. difettivo).

Dopo l'asportazione chirurgica, i pezzi operatori erano sottoposti ad esame istopatologico. Le sezioni ricavate dai tumori venivano colorate con ematossilina-eosina ed erano, altresì, sottoposte ad esami immunoistochimici per lo studio specifico della vascolarizzazione. L'esame immunoistochimico era effettuato mediante l'utilizzo di anticorpi primari anti-CD34 (QBEnd/10) allo scopo di evidenziare presenza e morfologia dei vasi, è stato inoltre utilizzato l'anticorpo WT1 (Ventana) (6F-H2) per evidenziare in particolare i vasi neoformati.

La presenza di vasi nei campioni è stata valutata su una scala semi-quantitativa, CD34: 0 quando i vasi erano pressoché assenti; 1 quando la densità della vascolarizzazione era simile a quella della mucosa normale; 2 quando era lievemente aumentata; 3 quando era fortemente aumentata.

All'espressione di WT1 era assegnato un grading in modo simile; 0 quando i vasi erano quasi assenti; 1 quando la vascolarizzazione era meno del 10%; 2 quando la densità vascolare era

compresa tra il 10 ed il 50%, 3 quando era oltre il 50%. Il campione era n primo luogo esaminato a basso ingrandimento ed in seguito venivano selezionati quattro punti da osservare ad elevato ingrandimento (400x) allo scopo di valutare la vascolarizzazione.

Analisi statistica

Sono state calcolate le medie e le deviazioni standard dei diametri dei vasi identificati nella immagini CLE di mucosa normale e neoplastica; sono state calcolate le differenze delle medie e gli intervalli di confidenza (CI) al 95%. Similmente, l'associazione tra caratteristiche vascolari di neoplasia e mucosa normali sono state espresse come rischio relativo (OR) e CI 95% per ogni paziente.

Valori di OR superiori a 1 indicano che una caratteristica alle immagini CLE è più frequente nelle lesioni tumorali. Nelle caselle con valore 0, è stato aggiunto un valore di 0.5 per l'analisi. A seconda dei dati individuali dei pazienti, è stata effettuata l'analisi aggregata e ponderata delle differenze delle medie (WMD) utilizzando un modello fisso. In questo modello, ogni osservazione (OR, WMD) ha un peso diverso a secondo della precisione dell'osservazione (varianza inversa) correlata al numero di immagini valutabili ottenuti da quel paziente.

L'analisi aggregata ha anche permesso di stimare l'eterogeneità dei dati ottenuti dai pazienti, testati con Q-statistic e con I² statistic. In più, la robustezza dei risultati è stata verificata ripetendo l'analisi in un contesto di modello random.

In questo modello, ogni osservazione di singolo paziente (OR, WMD) contribuisce all'analisi aggregata in maniera indipendente dal numero di immagini disponibile per quel dato paziente, di modo da tenere in considerazione la potenziale differenza clinica tra i pazienti. È stata valutata l'influenza sui risultati del grado istologico di differenziazione dei tumori escludendo i pazienti con neoplasia scarsamente differenziate (G2-3) e ripetendo l'analisi.

Sono state indagate altre differenze tra le percentuali utilizzando il test Chi-Quadro ed il Test Esatto di Fisher. Per l'analisi statistica, un valore di $P \leq 0,05$ era considerato statisticamente significativo. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software STATA 12 (STATA Corp, College Station, Texas, USA).

Risultati

Sono stati inclusi nello studio quattordici pazienti (10 uomini, 4 donne), per un totale di 14 lesioni. Dieci di queste lesioni erano localizzate a livello del sigma, due nel colon sinistro e due nel colon destro. All'istologico definitivo sul pezzo operatorio, secondo la classificazione UICC, sei pazienti presentavano una malattia in stadio I (3 pT1, 3 pT2), cinque una malattia allo stadio II (tutti pT3) e tre pazienti presentavano metastasi linfonodale (Stadio III: pT3N1). Il grado di differenziazione riscontrato è stato buono (G1) in tutti i pazienti tranne quattro (due G2, due G3).

La durata totale dell'esame è risultata essere di circa 8 minuti più lunga di una normale colonscopia in luce bianca a causa del tempo trascorso a registrare sequenze video. Non sono insorte complicanze endoscopiche o reazioni avverse alla fluoresceina a parte una colorazione giallastra della cute, già riportata in letterature e che di solito persiste per 1-6 ore. Sono stati registrati ventotto video di 4 minuti ognuno (14 dal tessuto tumorale, 14 dalla mucosa normale).

Alla velocità di scansione di 12 fps, sono state registrate 2880 immagini dal tessuto tumorale e dalla mucosa normale. In totale, sono state selezionate 283 immagini in cui erano visibili strutture vascolari (203 dal tessuto tumorale, 80 dalla mucosa normale). Dopo la valutazione della qualità, 199 immagini (70%) sono state giudicate di qualità "buona" o "media" e sono state ulteriormente analizzate (57 da tessuto normale, 142 da tessuto tumorale). Il numero di immagini di scarsa qualità non è risultato significativamente differente tra il tessuto neoplastico e quello normale (30.1% vs 28.75%; $P > 0.05$).

È stato trovato un numero significativamente più grande di immagini in cui era visibile un pattern ghiandolare nel tessuto tumorale rispetto alla mucosa normale ($P < 0.001$), questo fenomeno può essere spiegato con il fatto che il tessuto tumorale è più vascolarizzato.

Pattern Morfologici alle immagini CLE

Le immagini della mucosa normale mostravano vasi di morfologia regolare, solitamente disposti a circondare le cripte mucose; questi stessi vasi erano in gran parte dritti e di calibro costante (Fig. 5). I vasi del tessuto neoplastico, invece, si presentavano irregolari e con calibro variabile, spesso erano presenti neo-vasi tronchi ed aree di flusso difettivo. (fig. 6 e 7).

Il diametro medio dei vasi delle neoplasie è risultato essere significativamente più grande del diametro dei vasi della mucosa normale (WMD 3.38, 95% CI 2.65-4.11, $P=0.01$) e con una variabilità maggiore tra i pazienti. (Tabella 2)

Allo stesso modo, la tortuosità (*Branching*) dei vasi (OR 2.74, 95% CI 1.23–6.14, $P = 0.01$), l'extravasazione di fluoresceina (*leakage*) (OR 3.46, 95% CI 1.39–8.57, $P = 0.01$) ed i tratti di flusso difettivo (OR 2.52, 95% CI 0.99–6.37, $P = 0.05$) erano significativamente più frequenti nelle sequenze video di tessuto neoplastico rispetto alla normale mucosa colo-rettale. (Fig. 8)

I risultati sono stati uniformi tra tutti i pazienti inclusi nello studio: non è stata riscontrata eterogeneità nell'analisi aggregata. (Tabella 2) Quando l'analisi aggregata è stata ripetuta nel contesto di random modeling, tutti i risultati sono stati confermati: il diametro dei vasi risultava comunque essere più elevato nelle neoplasia (WMD 7.59, 95% CI 4.23–10.97, $P < 0.01$) mentre tutti gli altri risultati erano sostanzialmente sovrapponibili a quelli ottenuti nel modello fisso.

Inoltre, questi risultati sembravano indipendenti dal grado di differenziazione del tumore: quando i pazienti con neoplasia scarsamente differenziata all'istologico definitivo (G2, G3) venivano esclusi dall'analisi, tutte le caratteristiche erano ancora significativamente associate alle immagini tumorali.

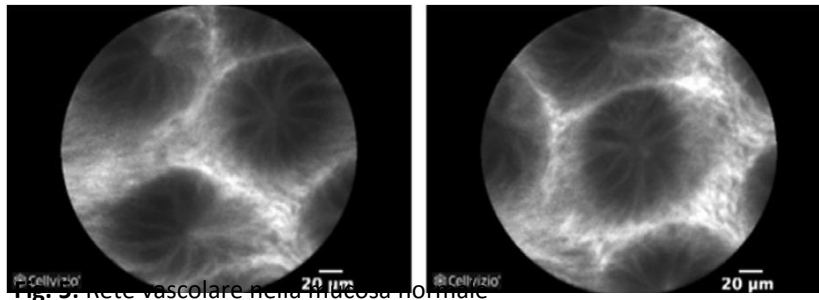


Fig. 5: Rete vascolare nella mucosa normale

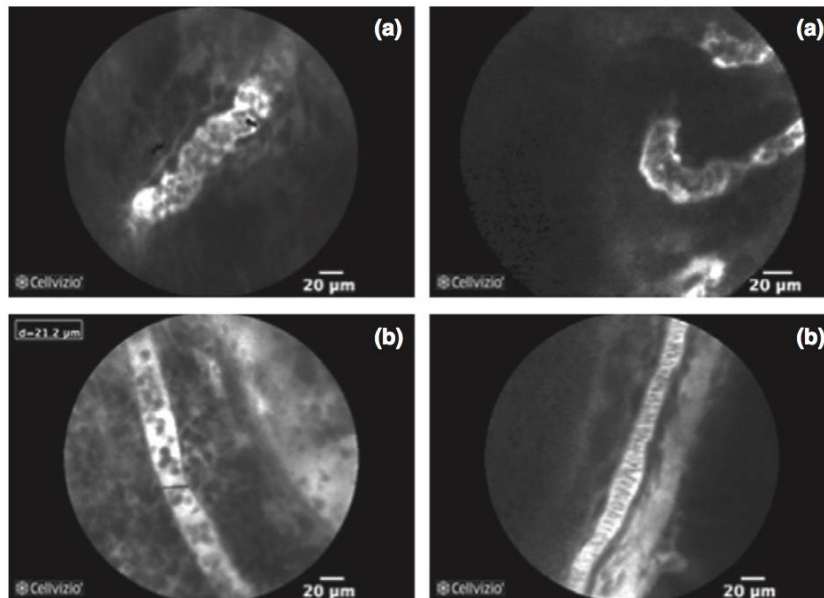
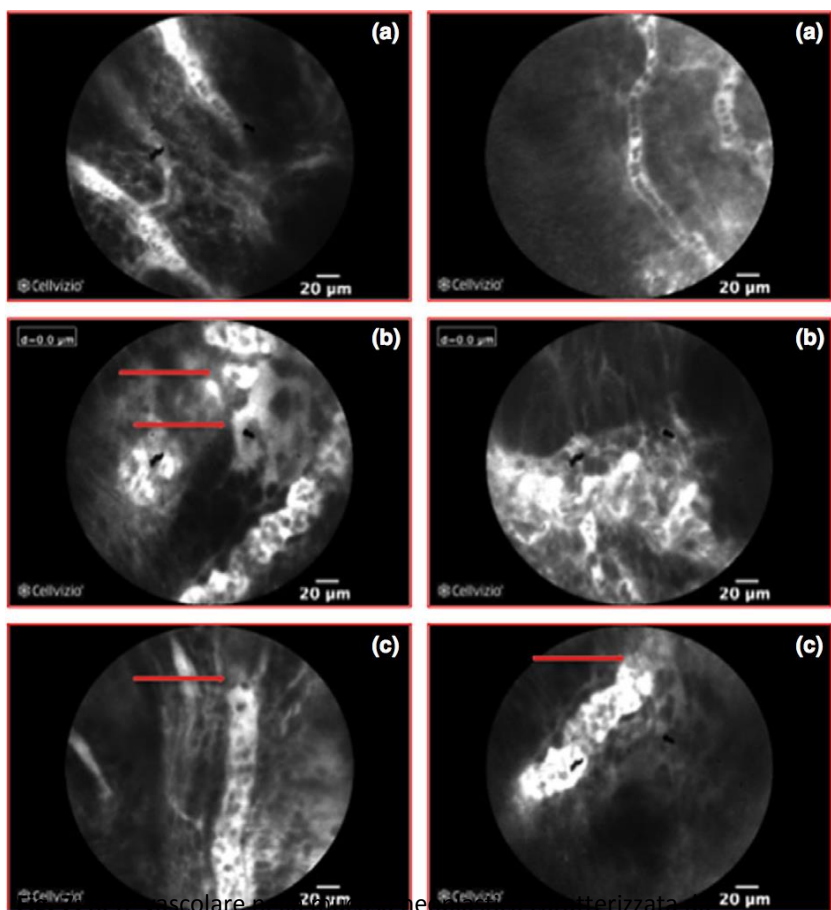


Fig. 6: Rete vascolare nella mucosa neoplastica caratterizzata da vasi tortuosi (a) e dilatati (b).

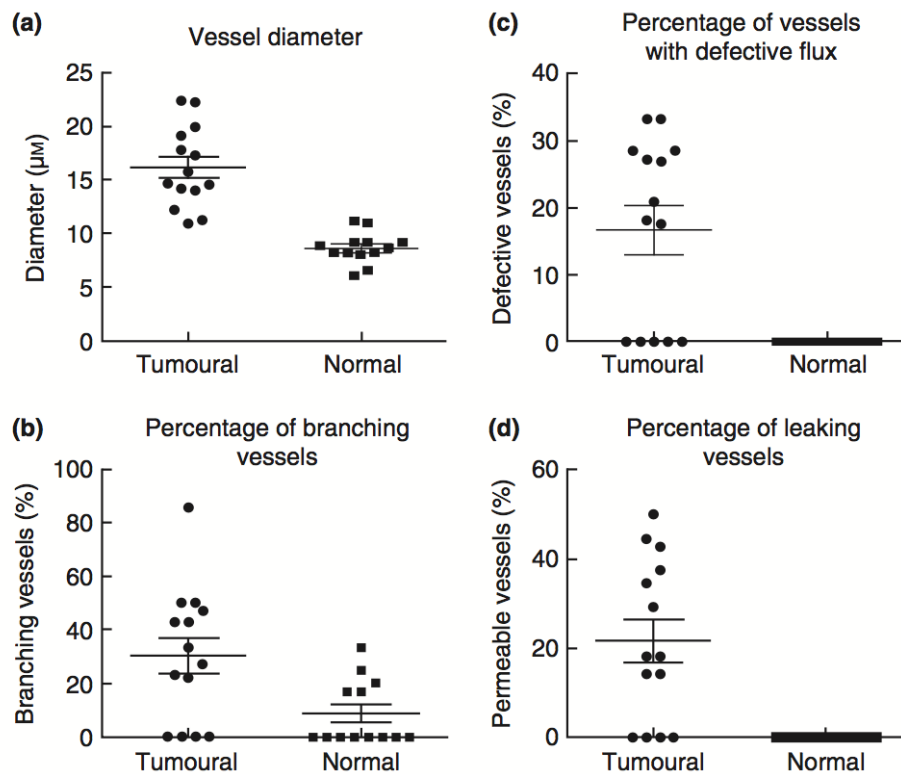


branching vascolare (a), leakage di fluoresceina (b, freccia) e flussi difettivo (c, freccia).

Tabella 2: Risultati CLE

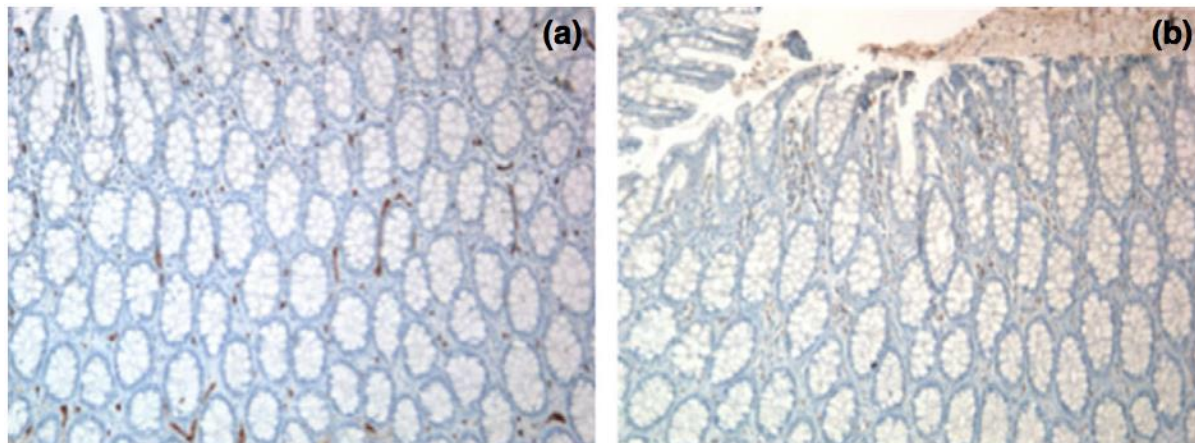
Caratteristiche dei vasi	Immagine CLE	Eterogeneità
Diametro (μm)	WMD 3.38 (2.65–4.11), $P = 0.01$	$Q=146, P=0.0, I^2 = 93.9\%$
Branching	OR 2.74 (1.23–6.14), $P = 0.01$	$Q=4.85, P=0.98, I^2 = 0.0\%$
Vasi permeabili	OR 3.46 (1.39–8.57), $P = 0.01$	$Q=3.89, P=0.99, I^2 = 0.0\%$
Flusso difettivo	OR 2.52 (0.99–6.37), $P = 0.05$	$Q=2.80, P=0.99, I^2 = 0.0\%$
Forma dei vasi		
Dritti	OR 0.2 (0.09–0.47), $P = 0.01$	$Q=5.87, P=0.95, I^2 = 0.0\%$
Irregolari	OR 5.07 (2.17–11.8), $P = 0.01$	$Q=5.76, P=0.95, I^2 = 0.0\%$

Fig.8: Caratteristiche dei vasi di tessuto normale e neoplastico



Immunoistochimica

Le analisi immunoistochimiche corroboravano i risultati ottenuto con la p-CLE. Le sezioni di tessuto neoplastico mostravano una vascolarizzazione più accentuata (livello di espressione di CD34 più elevato), dovuta alla presenza di vasi neoformati come dimostrato dal riscontro di espressione maggiore di WT1 ($P=0.03$) (Fig. 9 e 10)



I vasi neoformati, colorati con l'anticorpo WT1 presentavano più frequentemente tortuosità e morfologia irregolare ($P=0.05$). Inoltre, nel tessuto tumorale è stata riscontrata una significativa dilatazione vascolare rispetto alla mucosa normale: la dilatazione era presente in tutti i vasi (Colorazione con CD34, $P=0.05$). Anche se la dilatazione dei vasi neoformati era più frequente nelle sezioni di tessuto tumorale rispetto al tessuto normale (30% vs 0%)

Fig. 9: Immunoistochimica di tessuto colico normale. Nella mucosa colica normale, l'immunocolorazione per CD34 evidenzia piccoli vasi tra le ghiandole (a). Questi vasi risultano negativi alla colorazione per WT1 (b). Immagini ad ingrandimento 100x.

questo riscontro non aveva significatività statistica ($P=0.13$).

Discussione

I vasi nei tumori mostrano una morfologia differente rispetto ai capillari normali. In generale, i vasi ematici del tessuto neoplastico presentano molteplici anomalie strutturali e funzionali. Le neoplasie mostrano un architettura vascolare caotica con irregolarità di calibro, tratti a fondo cieco e multiple ramificazioni disorganizzate. Lo studio della neoangiogenesi e della morfologia anormale nei tumori rende la valutazione dei pattern capillari risulta molto importante nella diagnosi endoscopica di displasia e cancro.

L'endomicroscopia laser confocale è una tecnica relativamente nuova che permette una valutazione istopatologica in tempo reale dei tessuti umani. Sono state descritte applicazioni in chirurgia gastrointestinale, in pneumologia ed in neurochirurgia. ^[43–46]

L'applicazione della CLE in questi studi si basa sulla valutazione dei pattern cellulari per differenziare i tessuti normali dalle lesioni cancerose.

Sono già disponibili dati preliminari sulla possibilità di studiare la densità microvascolare per la rilevazione di neoplasie biliari, su esofago di Barrett e su alcuni tumori gastroenterici. ^[24,47–50]

Le casistiche di questi studi comprendono piccolo gruppi di pazienti e si basano, di solito, su informazioni ottenute dall'analisi CLE e dall'esame immunoistochimico di biopsie del tratto digerente ^[51–53]

Abbiamo aggiunto un tipo di analisi immunoistochimica alla nostra casistica; il ruolo di WT1 come marker di angiogenesi è stato precedentemente descritto così come è stata descritta la possibilità di discriminare tra neoangiogenesi tumorale e malformazione vascolare. ^[54,55]

Abbiamo dato un grading al livello di espressione di WT1 ed abbiamo rilevato un'espressione significativa di questa proteina (Grado 2 e 3) nell'87,5% dei pazienti analizzati. Tutto ciò indica che la CLE può essere considerato uno strumento affidabile per identificare i pattern vascolari peculiari delle lesioni tumorali coloretali e della neoangiogenesi.

In questo studio abbiamo dimostrato come la rete capillare della mucosa coloretale sia chiaramente visibile durante esami CLE in tempo reale. La fluoresceina rimane prevalentemente nei vasi di modo da permettere di ottenere buone immagini della rete capillare e della neoangiogenesi. È possibile identificare la fine architettura delle strutture microvascolari, le pareti vasali ed anche i globuli rossi.

I vasi capillari, per esempio, risultano molto più chiari delle cellule epiteliali grazie al flusso di fluoresceina che permea queste strutture. I vasi ematici, inoltre, si presentano più dilatati e tortuosi nel tessuto neoplastico rispetto al normale.

In aggiunta a questo, la tortuosità capillare, l'extravasazione di colorante fluorescente (leakage di fluoresceina) e le aree di flusso difettivo, erano significativamente più rappresentate nel tessuto tumorale.

Possiamo immaginare che questo tipo di informazione possa un giorno aiutare a predire la risposta di una neoplasia alla terapia anti-angiogenetica.

Siamo convinti che uno dei principali svantaggi di questa tecnica risieda nella limitata capacità di penetrazione della luce laser. Infatti, la profondità di penetrazione è approssimativamente 60 µm, quindi i vasi della sottomucosa non risultano visibili alla CLE.

La densità vascolare non è stata valutata in questo studio dal momento che la CLE fornisce solo immagini bidimensionali. La determinazione della densità vascolare potrebbe essere ottenuta con l'utilizzo di un prototipo di software di ricostruzione vascolare (Vessel Viewer; Mauna Kea Technologies). Dati preliminari mostrano come sia possibile determinare la lunghezza, l'area ed il volume, il numero di segmenti vascolari ed il loro diametro. [24,48]

Il nostro è stato uno studio di fattibilità ed, in un certo senso, speculativo; il principale obiettivo era quello di aggiungere una descrizione ulteriore dei pattern vascolari e delle caratteristiche della neoangiogenesi alla p-CLE. Sono ancora necessari ulteriori studi per stabilire le applicazioni cliniche su larga scala della p-CLE nel campo dello studio del tumore coloretale.

Conclusioni

L'endomicroscopia laser confocale con sonde (p-CLE) è in grado di fornire una caratterizzazione non invasiva dell'architettura microvascolare della mucosa colica. Sono stati descritti diversi pattern morfologici in grado di discriminare tra il network microvascolare normale e maligno nella mucosa coloretale.

Bibliografia

1. Ries LA, Wingo PA, Miller DS, Howe HL, Weir HK, Rosenberg HM, Vernon SW, Cronin K, Edwards BK. The annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1997, with a special section on colorectal cancer. *Cancer* 2000;**88**:2398–424 [PMID: 10820364]
2. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LAG, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 2003;**95**:1276–99 [PMID: 12953083]
3. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C, Gastrointestinal Consortium Panel. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;**124**:544–60 [PMID: 12557158]
4. Winawer SJ, Zauber AG, Ho MN, O'Brien MJ, Gottlieb LS, Sternberg SS, Waye JD, Schapiro M, Bond JH, Panish JF. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993;**329**:1977–81 [PMID: 8247072]
5. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2009;**150**:1–8 [PMID: 19075198]
6. Kahi CJ, Imperiale TF, Juliar BE, Rex DK. Effect of screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;**7**:770–5; quiz 711 [PMID: 19268269]
7. Pimentel-Nunes P, Dinis-Ribeiro M, Ponchon T, Repici A, Vieth M, De Ceglie A, Amato A, Berr F, Bhandari P, Bialek A, Conio M, Haringsma J, Langner C, Meisner S, Messmann H, Morino M, Neuhaus H, Piessevaux H, Ruge M, Saunders BP, Robaszekiewicz M, Seewald S, Kashin S, Dumonceau J-M, Hassan C, Deprez PH. Endoscopic submucosal dissection: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* 2015;**47**:829–54 [PMID: 26317585]
8. Zorzi M, Senore C, Da Re F, Barca A, Bonelli LA, Cannizzaro R, Fasoli R, Di Furia L, Di Giulio E, Mantellini P, Naldoni C, Sassatelli R, Rex D, Hassan C, Zappa M, Equipe Working Group. Quality of colonoscopy in an organised colorectal cancer screening programme with immunochemical faecal occult blood test: the EQuIPE study (Evaluating Quality Indicators of the Performance of Endoscopy). *Gut* 2015;**64**:1389–96 [PMID: 25227521]
9. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002. *Gastrointest Endosc* 2003;**58**:S3–43 [PMID: 14652541]
10. Rotondano G, Bianco MA, Buffoli F, Gizzi G, Tessari F, Cipolletta L. The Cooperative Italian FLIN Study Group: prevalence and clinico-pathological features of colorectal laterally spreading tumors. *Endoscopy* 2011;**43**:856–61 [PMID: 21826628]
11. Saitoh Y, Obara T, Watari J, Nomura M, Taruishi M, Orii Y, Taniguchi M, Ayabe T, Ashida T, Kohgo Y. Invasion depth diagnosis of depressed type early colorectal cancers by combined use of videoendoscopy and chromoendoscopy. *Gastrointest Endosc* 1998;**48**:362–70 [PMID: 9786107]
12. Uraoka T, Saito Y, Matsuda T, Ikehara H, Gotoda T, Saito D, Fujii T. Endoscopic indications for

endoscopic mucosal resection of laterally spreading tumours in the colorectum. *Gut* 2006;**55**:1592–7 [PMID: 16682427]

13. Kudo S. Endoscopic mucosal resection of flat and depressed types of early colorectal cancer. *Endoscopy* 1993;**25**:455–61 [PMID: 8261988]
14. van Doorn SC, Hazewinkel Y, East JE, van Leerdam ME, Rastogi A, Pellisé M, Sanduleanu-Dascalescu S, Bastiaansen BAJ, Fockens P, Dekker E. Polyp morphology: an interobserver evaluation for the Paris classification among international experts. *Am J Gastroenterol* 2015;**110**:180–7 [PMID: 25331346]
15. Kamiński MF, Hassan C, Bisschops R, Pohl J, Pellisé M, Dekker E, Ignjatovic-Wilson A, Hoffman A, Longcroft-Wheaton G, Heresbach D, Dumonceau J-M, East JE. Advanced imaging for detection and differentiation of colorectal neoplasia: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline. *Endoscopy* 2014;**46**:435–49 [PMID: 24639382]
16. Ribeiro MS, Wallace MB. Endoscopic Treatment of Early Cancer of the Colon. *Gastroenterol Hepatol* 2015;**11**:445–52 [PMID: 27118940]
17. Repici A, Pellicano R, Strangio G, Danese S, Fagoonee S, Malesci A. Endoscopic mucosal resection for early colorectal neoplasia: pathologic basis, procedures, and outcomes. *Dis Colon Rectum* 2009;**52**:1502–15 [PMID: 19617768]
18. Moss A, Bourke MJ, Williams SJ, Hourigan LF, Brown G, Tam W, Singh R, Zanati S, Chen RY, Byth K. Endoscopic mucosal resection outcomes and prediction of submucosal cancer from advanced colonic mucosal neoplasia. *Gastroenterology* 2011;**140**:1909–18 [PMID: 21392504]
19. Hassan C, Repici A, Sharma P, Correale L, Zullo A, Bretthauer M, Senore C, Spada C, Bellisario C, Bhandari P, Rex DK. Efficacy and safety of endoscopic resection of large colorectal polyps: a systematic review and meta-analysis. *Gut* 2016;**65**:806–20 [PMID: 25681402]
20. Moss A, Williams SJ, Hourigan LF, Brown G, Tam W, Singh R, Zanati S, Burgess NG, Sonson R, Byth K, Bourke MJ. Long-term adenoma recurrence following wide-field endoscopic mucosal resection (WF-EMR) for advanced colonic mucosal neoplasia is infrequent: results and risk factors in 1000 cases from the Australian Colonic EMR (ACE) study. *Gut* 2015;**64**:57–65 [PMID: 24986245]
21. Oka S, Tanaka S, Kanao H, Ishikawa H, Watanabe T, Igarashi M, Saito Y, Ikematsu H, Kobayashi K, Inoue Y, Yahagi N, Tsuda S, Simizu S, Iishi H, Yamano H, Kudo S-E, Tsuruta O, Tamura S, Saito Y, Cho E, Fujii T, Sano Y, Nakamura H, Sugihara K, Muto T. Current status in the occurrence of postoperative bleeding, perforation and residual/local recurrence during colonoscopic treatment in Japan. *Dig Endosc* 2010;**22**:376–80 [PMID: 21175503]
22. Repici A, Hassan C, De Paula Pessoa D, Pagano N, Arezzo A, Zullo A, Lorenzetti R, Marmo R. Efficacy and safety of endoscopic submucosal dissection for colorectal neoplasia: a systematic review. *Endoscopy* 2012;**44**:137–50 [PMID: 22271024]
23. Hon SS, Ng SS, Wong TC, Chiu PW, Mak TW, Leung WW, Lee JF. Endoscopic submucosal dissection vs laparoscopic colorectal resection for early colorectal epithelial neoplasia. *World J Gastrointest Endosc* 2015;**7**:1243–9 [PMID: 26634040]
24. Meining A, Wallace MB. Endoscopic imaging of angiogenesis in vivo. *Gastroenterology* 2008;**134**:915–8 [PMID: 18395072]
25. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;**23**:1011–27 [PMID: 15585754]

26. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;**3**:401–10 [PMID: 12778130]
27. Sumimoto K, Tanaka S, Shigita K, Hayashi N, Hirano D, Tamaru Y, Ninomiya Y, Oka S, Arihiro K, Shimamoto F, Yoshihara M, Chayama K. Diagnostic performance of Japan NBI Expert Team classification for differentiation among noninvasive, superficially invasive, and deeply invasive colorectal neoplasia. *Gastrointest Endosc* 2017;**86**:700–9 [PMID: 28257790]
28. Sano Y, Tanaka S, Kudo S-E, Saito S, Matsuda T, Wada Y, Fujii T, Ikematsu H, Uraoka T, Kobayashi N, Nakamura H, Hotta K, Horimatsu T, Sakamoto N, Fu K-I, Tsuruta O, Kawano H, Kashida H, Takeuchi Y, Machida H, Kusaka T, Yoshida N, Hirata I, Terai T, Yamano H-O, Kaneko K, Nakajima T, Sakamoto T, Yamaguchi Y, Tamai N, Nakano N, Hayashi N, Oka S, Iwatate M, Ishikawa H, Murakami Y, Yoshida S, Saito Y. Narrow-band imaging (NBI) magnifying endoscopic classification of colorectal tumors proposed by the Japan NBI Expert Team. *Dig Endosc* 2016;**28**:526–33 [PMID: 26927367]
29. Thurston AW, Cole JA, Hillman LS, Im JH, Thorne PK, Krause WJ, Jones JR, Eber SL, Forte LR. Purification and properties of parathyroid hormone-related peptide isolated from milk. *Endocrinology* 1990;**126**:1183–90 [PMID: 2153521]
30. Tanaka S, Sano Y. Aim to unify the narrow band imaging (NBI) magnifying classification for colorectal tumors: current status in Japan from a summary of the consensus symposium in the 79th Annual Meeting of the Japan Gastroenterological Endoscopy Society. *Dig Endosc* 2011;**23 Suppl 1**:131–9 [PMID: 21535219]
31. Kiesslich R, Canto MI. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2009;**19**:261–72 [PMID: 19423023]
32. De Palma GD. Confocal laser endomicroscopy in the ‘in vivo’ histological diagnosis of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2009;**15**:5770–5 [PMID: 19998496]
33. Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005;**15**:715–31 [PMID: 16278135]
34. De Palma GD, Staibano S, Siciliano S, Persico M, Masone S, Maione F, Siano M, Mascolo M, Esposito D, Salvatori F, Persico G. In vivo characterisation of superficial colorectal neoplastic lesions with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in combination with video-mosaicing: a feasibility study to enhance routine endoscopy. *Dig Liver Dis* 2010;**42**:791–7 [PMID: 20409761]
35. Kiesslich R, Goetz M, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy for gastrointestinal diseases. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2008;**18**:451–66, viii [PMID: 18674696]
36. Pawley JB. Limitations on optical sectioning in live-cell confocal microscopy. *Scanning* 2002;**24**:241–6 [PMID: 12392355]
37. Kiesslich R, Neurath MF. Endoscopic confocal imaging. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;**3**:S58–60 [PMID: 16012999]
38. Goetz M, Watson A, Kiesslich R. Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J Biophotonics* 2011;**4**:498–508 [PMID: 21567975]
39. Sakashita M, Inoue H, Kashida H, Tanaka J, Cho JY, Satodate H, Hidaka E, Yoshida T, Fukami N, Tamegai Y, Shiokawa A, Kudo S. Virtual histology of colorectal lesions using laser-scanning confocal microscopy. *Endoscopy* 2003;**35**:1033–8 [PMID: 14648417]
40. Kiesslich R, Burg J, Vieth M, Gnaendiger J, Enders M, Delaney P, Polglase A, McLaren W,

- Janell D, Thomas S, Nafe B, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology* 2004;**127**:706–13 [PMID: 15362025]
41. Inoue H, Cho JY, Satodate H, Sakashita M, Hidaka E, Fukami S, Kazawa T, Yoshida T, Shiokawa A, Kudo S. Development of virtual histology and virtual biopsy using laser-scanning confocal microscopy. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2003;37–9 [PMID: 12797680]
 42. de Melo SW Jr, Wallace MB. Endoscopic colorectal imaging and therapy. *Curr Opin Gastroenterol* 2011;**27**:54–60 [PMID: 21042213]
 43. De Palma GD, Luglio G, Staibano S, Bucci L, Esposito D, Maione F, Mascolo M, Ilardi G, Forestieri P. Perioperative characterization of anastomotic doughnuts with high-resolution probe-based confocal laser endomicroscopy in colorectal cancer surgery: a feasibility study. *Surg Endosc* 2014;**28**:2072–7 [PMID: 24519027]
 44. Fuchs FS, Zirlik S, Hildner K, Schubert J, Vieth M, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy for diagnosing lung cancer in vivo. *Eur Respir J* 2013;**41**:1401–8 [PMID: 22997220]
 45. Chen SP, Liao JC. Confocal laser endomicroscopy of bladder and upper tract urothelial carcinoma: a new era of optical diagnosis? *Curr Urol Rep* 2014;**15**:437 [PMID: 25002073]
 46. Foersch S, Heimann A, Ayyad A, Spoden GA, Florin L, Mpoukouvalas K, Kiesslich R, Kempfski O, Goetz M, Charalampaki P. Confocal laser endomicroscopy for diagnosis and histomorphologic imaging of brain tumors in vivo. *PLoS One* 2012;**7**:e41760 [PMID: 22911853]
 47. Liu H, Li Y-Q, Yu T, Zhao Y-A, Zhang J-P, Zhang J-N, Guo Y-T, Xie X-J, Zhang T-G, Desmond PV. Confocal endomicroscopy for in vivo detection of microvascular architecture in normal and malignant lesions of upper gastrointestinal tract. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;**23**:56–61 [PMID: 18028347]
 48. Becker V, Vieth M, Bajbouj M, Schmid RM, Meining A. Confocal laser scanning fluorescence microscopy for in vivo determination of microvessel density in Barrett's esophagus. *Endoscopy* 2008;**40**:888–91 [PMID: 19009480]
 49. Gheonea DI, Cârțână T, Ciurea T, Popescu C, Bădăraș A, Săftoiu A. Confocal laser endomicroscopy and immunoendoscopy for real-time assessment of vascularization in gastrointestinal malignancies. *World J Gastroenterol* 2011;**17**:21–7 [PMID: 21218080]
 50. Wani S, Shah RJ. Probe-based confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;**29**:319–23 [PMID: 23507916]
 51. Ciocâlțeu A, Săftoiu A, Cârțână T, Gruionu LG, Pirici D, Georgescu CC, Georgescu C-V, Gheonea DI, Gruionu G. Evaluation of new morphometric parameters of neoangiogenesis in human colorectal cancer using confocal laser endomicroscopy (CLE) and targeted panendothelial markers. *PLoS One* 2014;**9**:e91084 [PMID: 24614504]
 52. Cârțână T, Săftoiu A, Gruionu LG, Gheonea DI, Pirici D, Georgescu CV, Ciocâlțeu A, Gruionu G. Confocal laser endomicroscopy for the morphometric evaluation of microvessels in human colorectal cancer using targeted anti-CD31 antibodies. *PLoS One* 2012;**7**:e52815 [PMID: 23285192]
 53. Cannizzaro R, Mongiat M, Canzonieri V, Fornasarig M, Maiero S, De Re V, Todaro F, De Paoli P, Spessotto P. Endomicroscopy and cancer: a new approach to the visualization of neoangiogenesis. *Gastroenterol Res Pract* 2012;**2012**:537170 [PMID: 22287958]
 54. Vasuri F, Fittipaldi S, Buzzi M, Degiovanni A, Stella A, D'Errico-Grigioni A, Pasquinelli G.

Nestin and WT1 expression in small-sized vasa vasorum from human normal arteries. *Histol Histopathol* 2012;**27**:1195–202 [PMID: 22806906]

55. Wagner N, Michiels JF, Schedl A, Wagner K-D. The Wilms' tumour suppressor WT1 is involved in endothelial cell proliferation and migration: expression in tumour vessels in vivo. *Oncogene* 2008;**27**:3662–72 [PMID: 18212735]